

蜘蛛香药材 HPLC 指纹图谱鉴别

鲁文琴¹ 程盛勇² 付洋² 郁林娜² 刘兴赋² 张玥³ 杨军^{4*} 罗喜荣^{2*}

(1. 贵州医科大学附属医院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025;

3. 贵州医科大学基础医学院, 贵州 贵阳 550025; 4. 中国科学院地球化学研究所, 贵州 贵阳 550081)

摘要:目的 建立蜘蛛香不同部位 HPLC 指纹图谱, 并比较各部位指纹图谱的差异。方法 采用 HPLC-DAD 波长切换法, DiamonSil[®] C₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm) 为色谱柱, 流动相: 乙腈(A) - 0.1% 甲酸水溶液(B) 梯度洗脱, 流速 1.0 ml · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长为 327 nm(0~33 min), 256 nm(33~90 min)。结果 建立了 10 批蜘蛛香不同部位 HPLC 指纹图谱, 标定了 32 个共有峰, 指认了 9 个共有峰; 蜘蛛香不同部位的化学组成相似, 但共有成分含量差异较大; 发现缬草三酯、23 号峰、乙酰缬草三酯等 5 个差异较大的成分。结论 所建立的蜘蛛香不同部位 HPLC 指纹图谱分析方法简便、准确、专属性好, 为蜘蛛香药材的全面质量控制和资源合理开发利用提供了科学依据。

关键词: 蜘蛛香; 不同部位; HPLC; 指纹图谱; 鉴别

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2020.01.037

中图分类号: R282.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0805(2020)01-0114-03

蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 为败酱科缬草属植物, 其性温、味辛、微苦, 具有理气止痛、消食止泻、祛风除湿、镇静安神等功效, 是唯一被《中国药典》2015 年版收载的缬草类生药^[1]。现代药学研究表明蜘蛛香含有缬草三酯类、黄酮类、酚酸类、挥发油等多种化学成分, 具有抗肿瘤、抗焦虑、神经保护、保肝、抗氧化、抗菌、抗病毒等药理作用^[2-11]。蜘蛛香系多年生草本, 传统以根茎及根入药, 是许多中成药的首选主药, 其叶作为非药用部位常被丢弃, 造成极大的资源浪费。指纹图谱是国内外广泛认可的一种中药质量评价模式, 能较全面地反映中药化学成分的种类和数量, 已有文献报道蜘蛛香根茎及根的指纹图谱研究, 尚无蜘蛛香不同部位指纹图谱比较研究^[12-14]。本研究首次建立了蜘蛛香不同部位 HPLC 指纹图谱, 利用相似度评价、聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)及偏最小二乘判别分析(PLS-DA)等分析技术, 比较蜘蛛香不同部位指纹图谱, 以期对蜘蛛香药材鉴定和合理开发利用提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); BSA224S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); FW177 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 材料 缬草三酯(批号 wkq16011203, 纯度 98.21%), 乙酰缬草三酯(批号 wkq16072004, 纯度 98.86%) 均购自四川维克奇生物科技有限公司; 橙皮苷(批号 110721-201316, 纯度 95.3%) 购自中国食品药品研究院; 新绿原酸(批号 MUST-15011412, 纯度 99.37%), 绿原酸(批号 MUST-15041814, 纯度 99.39%), 咖啡酸(批号 MUST-15090803, 纯度 99.99%), 异绿原酸 A(批号

MUST-15042518, 纯度 98.82%), 异绿原酸 B(批号 MUST-15081411, 纯度 99.05%), 异绿原酸 C(批号 MUST-15081414, 纯度 99.84%) 均购自成都曼思特生物科技有限公司; 乙腈、甲醇为色谱纯; 水为娃哈哈纯净水; 其余试剂均为分析纯。蜘蛛香药材为产地采集或药材市场购买, 经贵州医科大学药学教研室覃蓉贵教授鉴定为败酱科植物蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 的干燥叶、根茎及根, 见表 1。

表 1 样品信息

批次	产地	部位	采集时间
S1	贵州惠水	叶	20170603
S2	贵州惠水	根茎及根	20170603
S3	贵州惠水	叶	20170807
S4	贵州惠水	根茎及根	20170807
S5	贵州贵阳	叶	20170609
S6	贵州贵阳	根茎及根	20170609
S7	贵州惠水	叶	20170808
S8	贵州惠水	根茎及根	20170808
S9	云南保山	叶	20170819
S10	云南保山	根茎及根	20170819

2 方法与结果

2.1 色谱条件 DiamonSil[®] C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A) - 0.1% 甲酸水溶液(B) 梯度洗脱(0~18 min, 12%~30% A; 18~20 min, 30%~32% A; 20~23 min, 32%~40% A; 23~25 min, 40% A; 25~33 min, 40%~53% A; 33~90 min, 53%~85% A); 流速 1 ml · min⁻¹; 检测波长: 0~33 min 为 327 nm, 33~90 min 为 256 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取各对照品适量, 加甲醇溶解并稀释成每 1 ml 别含新绿原酸 0.006 mg、绿原酸 0.418 mg、咖啡酸 0.044 mg、异绿原酸 B 0.021 mg、橙皮苷 0.022 mg、异绿原酸 A 0.165 mg、异绿原酸 C 0.015 mg、乙酰缬草三酯 0.020 mg、缬草三酯 0.080 mg 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过 60 目筛) 0.2 g 置棕色 EP 管中, 加入 70% 甲醇 10 ml 称定重量, 于 37 °C 超声(功率 150W, 频率 40 kHz) 处理 40 min, 放置至室温, 称定重量, 用 70% 甲醇补足减失的重量, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 精密度试验 取 S6 样品按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以 19 号峰(异绿原酸 A) 为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积, 结果

收稿日期: 2019-05-28; 修订日期: 2019-10-28

基金项目: 贵州省联合基金项目(黔科合 LH 字[2014]7091 号);

贵州省社发攻关项目(黔科合 SY 字[2015]3032 号);

贵州省中药现代化专项项目(黔科合 ZY 字[2012]3010 号)

作者简介: 鲁文琴(1976-), 女(汉族), 贵州贵阳人, 贵州医科大学附属医院副主任医师, 学士学位, 主要从事药物新剂型新技术及药学信息工作。

* 通讯作者简介: 杨军(1972-), 男(苗族), 贵州松桃人, 中国科学院地球化学研究所副研究员, 硕士学位, 主要从事分析化学研究工作。

* 通讯作者简介: 罗喜荣(1973-), 女(汉族), 贵州松桃人, 贵州医科大学教授, 硕士研究生导师, 硕士学位, 主要从事药物新剂型新技术及天然药物化学研究工作。

各共有峰的相对保留时间 $RSD < 1.24\%$, 相对峰面积 $RSD < 3.56\%$ 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取 S6 样品按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,以 19 号峰(异绿原酸 A)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积,结果各共有峰的相对保留时间 $RSD < 1.14\%$,相对峰面积 $RSD < 3.61\%$,说明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取 S6 样品按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于 0、3、6、9、12、24 h 按“2.1”项下色谱条件进样,以 19 号峰(异绿原酸 A)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积,结果各共有峰的相对保留时间 $RSD < 1.92\%$,相对峰面积 $RSD < 3.33\%$ 表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4 共有峰的标定 取表 1 样品按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。将各样品色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)软件,以 S6 样品色谱图作为参照图谱,时间窗宽度设为 0.1 min,以中位数法生成对照图谱,经多点校正后进行色谱峰匹配和叠加,标定了 32 个共有峰,见图 1。

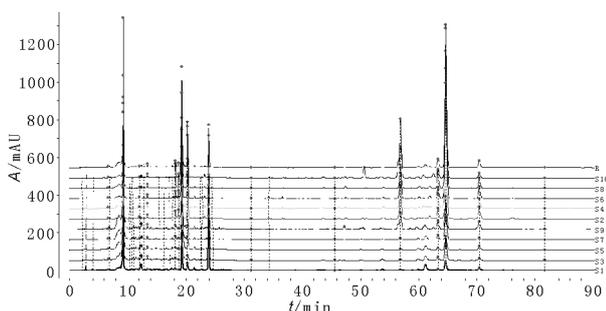


图 1 蜘蛛香不同部位 HPLC 指纹图谱

2.3.5 指纹图谱分析 根据各共有峰的紫外光谱特征,可将蜘蛛香不同部位指纹图谱分为两个区: I 区(保留时间 0~33 min) 25 个共有峰的最大吸收波长在 327 nm 左右,主要为酚酸类和黄酮类成分; II 区(保留时间 33~90 min) 7 个共有峰的最大吸收波长在 256 nm 左右,主要为缬草三酯类成分。以归一化法分别计算各样品色谱图 I 区和 II 区共有峰峰面积占总共有峰峰面积的比例,结果蜘蛛香叶 I 区共有峰峰面积占比均 $> 74\%$,蜘蛛香根茎及根 II 区共有峰峰面积占比均 $> 59\%$,表明蜘蛛香不同部位的共有成分含量差异较大,见表 2 和图 2。通过对照品保留时间和紫外光谱比对确认了 9 个共有峰,即 5 号峰为新绿原酸,6 号峰为绿原酸,10 号峰为咖啡酸,17 号峰为异绿原酸 B,18 号峰为橙皮苷,19 号峰为异绿原酸 A,20 号峰为异绿原酸 C,28 号峰为乙酰缬草三酯,30 号峰为缬草三酯,见图 3。

表 2 蜘蛛香不同部位共有成分的含量比例 %

批次	I 区		批次	II 区	
	I 区	II 区		I 区	II 区
S1	86.96	13.04	S2	28.24	71.76
S3	78.14	21.86	S4	33.40	66.60
S5	89.95	10.05	S6	27.28	72.72
S7	79.52	20.48	S8	35.60	64.40
S9	74.99	25.01	S10	40.19	59.81

2.3.6 参照峰的选择 异绿原酸 A 色谱峰在对照指纹图谱中分离度良好,峰面积较大,峰形稳定,为所有样品共有,故确定其为参照峰。以异绿原酸 A 为参照峰,计算各样本共有峰相对保留时间及相对峰面积,结果各共有峰的相对保留时间 RSD 均 $< 1.87\%$,表明各批次间样品共有峰出峰时间较稳定;相对峰面积 RSD 为 0~129.41%,说明各批次间样品共有成分含量差异较大。

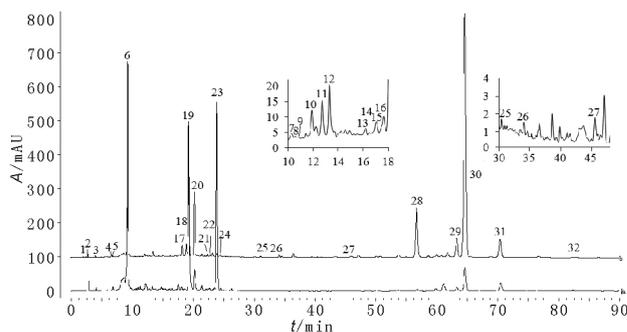
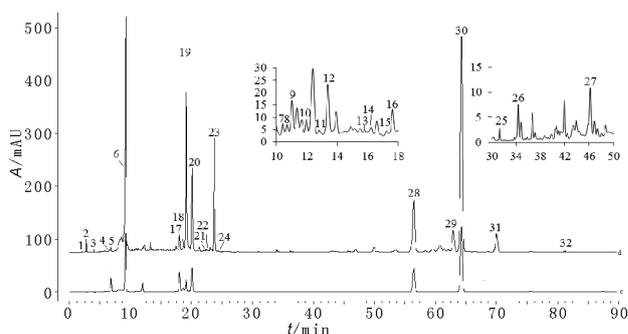


图 2 蜘蛛香叶(a)和蜘蛛香根茎及根(b) HPLC 指纹图谱比较



5. 新绿原酸; 6. 绿原酸; 10. 咖啡酸; 17. 异绿原酸 B; 18. 橙皮苷; 19. 异绿原酸 A; 20. 异绿原酸 C; 28. 乙酰缬草三酯; 30. 缬草三酯

图 3 混合对照品 HPLC 图(c)

和蜘蛛香不同部位 HPLC 对照指纹图谱(d)

2.4 指纹图谱评价

2.4.1 相似度评价 以对照指纹图谱为参照,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)软件计算各样品的相似度,结果 S1~S10 相似度分别为 0.605、0.916、0.773、0.928、0.662、0.914、0.799、0.941、0.761、0.912,表明不同产地、同一部位样品均有良好的相似性,但不同部位样品间相似度差异较大,说明蜘蛛香不同部位的指纹图谱有明显区别。

2.4.2 聚类分析 将各样品共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件进行聚类分析,见图 4。结果蜘蛛香样品可分为 2 类, I 类包括 S1、S3、S5、S7、S9, II 类包括 S2、S4、S6、S8、S10,表明蜘蛛香叶、根茎及根被正确区分。

2.4.3 主成分分析 将各样品共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析,见图 5。结果表明前 2 个主成分的累积方差贡献率为 88.80%,可将蜘蛛香样品分为 2 组,与聚类分析结果一致。

2.4.4 偏最小二乘判别分析 将各样品共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件进行偏最小二乘判别分析,见图 6。结果 PLS-DA 模型主成分回归系数 $Q^2 = 0.925$ 、模型区分参数 $R^2Y = 0.982$ 、矩阵结实率 $R^2X = 0.811$,均 > 0.5 ,说明该模型对 2 组样本的区分程度和预测能力强,可用于蜘蛛香不同部位的鉴别区分。PLS-DA 模型中的 VIP 值可反映色谱峰的贡献程度,以 $VIP > 1$ 为标准,30 号峰(缬草三酯)、23 号峰、28 号峰(乙酰缬草三酯)、6 号峰(绿原酸)、20 号峰(异绿原酸 C)可能是导致蜘蛛香不同部位间质量差异的主要标记物。

3 讨论

本研究比较了水及体积分数 20%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 甲醇 9 种提取溶剂,以体积分数 70% 甲醇提取

的样品色谱峰个数最多,峰面积整体较高,故选择体积分数 70% 甲醇提取。考察了 206、256、284、327、350 nm 波长下蜘蛛香样品色谱图特征峰,结果发现 327 nm 波长下酚酸类和黄酮类成分主要集中在 I 区(保留时间 0~33 min),256 nm 波长下缬草三酯类成分主要集中在 II 区(保留时间 33~90 min),酚酸类和黄酮类成分与缬草三酯类成分之间无明显交叉分布区域,因此采用波长切换法建立了蜘蛛香不同部位 HPLC 指纹图谱,其色谱峰较多、峰形较好、化合物信息更丰富完整。蜘蛛香酚酸类和黄酮类成分呈弱酸性,本研究采用乙腈-甲酸水溶液、乙腈-乙酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液等流动相体系进行梯度洗脱,结果显示乙腈-0.1% 甲酸水溶液洗脱系统基线较平稳、色谱峰较多、峰形较好、分离效果良好。

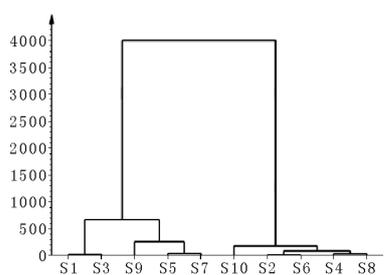


图 4 蜘蛛香不同部位聚类分析树状图

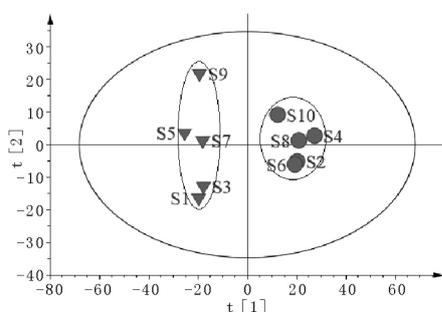


图 5 蜘蛛香不同部位 PCA 得分图

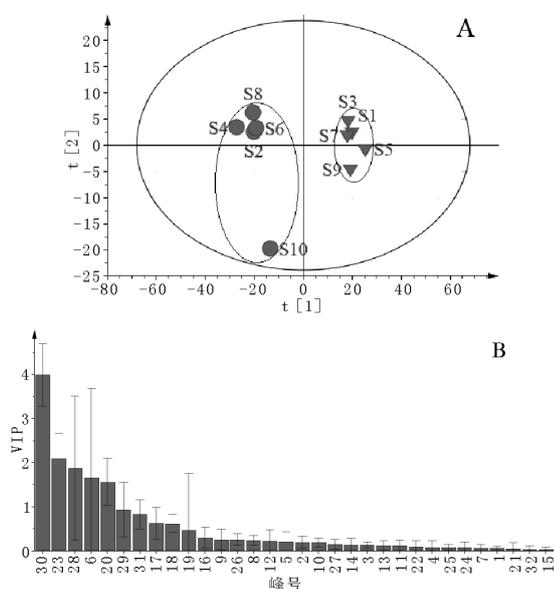


图 6 蜘蛛香不同部位 PLS-DA 得分图(A)和 VIP 图(B)

同一基源的中药,因其药用部位的不同,不仅导致其药力的差异,还可能因其性味归经的大相径庭,这也是中医选择有效部位入药的原因所在,但有些植物的不同部位常含有相同或相似的有效成分和生理活性,只是含量多少和药效强弱的差异^[15]。应用指纹图谱技术结合化学模式识别能很好地对中药不同部位进行特征研究和质量评价,本研究采用相似度评价、聚类分析、主成分分析和偏最小二乘判别分析对蜘蛛香不同部位指纹图谱进行比较,结果显示蜘蛛香叶、根茎及根被明显分为两类,表明蜘蛛香不同部位的化学成分构成相近,但共有成分含量差异较大,蜘蛛香叶中酚酸类成分含量较高而缬草三酯类成分含量较低,蜘蛛香根茎及根中缬草三酯类成分含量较高而酚酸类成分含量较低,二者的功效相似还是各有专攻,尚待进一步研究;找到 30 号峰(缬草三酯)、23 号峰、28 号峰(乙酰缬草三酯)、6 号峰(绿原酸)、20 号峰(异绿原酸 C)等样品间特征成分标记物,建议作为蜘蛛香药材的质量控制指标建立相应的不同部位质量标准,以便蜘蛛香不同部位的区别使用。

本研究建立的蜘蛛香不同部位 HPLC 指纹图谱标定了 32 个共有峰,指认了 9 种成分,包括 6 个酚酸类、1 个黄酮类、2 个缬草三酯类成分,共 3 种化学结构类型,具有灵敏度高、分离度好、化合物信息丰富、特征性强等优点,可用于蜘蛛香药材不同部位的识别,对阐明蜘蛛香不同部位药效物质基础、完善蜘蛛香质量控制和促进蜘蛛香的充分利用等具有重要意义,为蜘蛛香药用资源拓展及其新药研发提供了新的思路。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典,一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:368.
- [2] 杨军,龙庆德,罗喜荣,等. 超临界二氧化碳萃取蜘蛛香油工艺的研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(1):157.
- [3] 田弋夫,龙庆德,罗喜荣,等. 蜘蛛香油化学成分的气相色谱-飞行时间质谱分析[J]. 时珍国医国药,2012,23(4):924.
- [4] 罗喜荣,罗俊,杨军,等. 蜘蛛香不同部位中总缬草三酯含量测定[J]. 安徽农业科学,2012,40(16):8884,9106.
- [5] 罗喜荣,苑天红,杨军,等. 超临界 CO₂ 萃取蜘蛛香中总缬草三酯的工艺研究[J]. 广东农业科学,2012,39(16):119.
- [6] 罗喜荣,苑天红,杨军,等. 超临界 CO₂ 萃取蜘蛛香中缬草素工艺优化[J]. 湖北农业科学,2013,52(8):1901,1912.
- [7] 李蓉,李小平,吴莹. 紫外分光光度法测定蜘蛛香中总黄酮的含量[J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(12):149.
- [8] 刘开萍,杨军,罗喜荣,等. 蜘蛛香中绿原酸及总酚酸的含量测定[J]. 湖北农业科学,2017,56(2):288.
- [9] 刘开萍,杨军,程盛勇,等. HPLC 法同时测定蜘蛛香中 7 种成分含量[J]. 中药材,2018,41(4):922.
- [10] 陈畅,李韶菁,唐仕欢,等. 蜘蛛香药理研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(14):2174.
- [11] 翟欣,孔周扬,王素娟,等. 蜘蛛香提取物及总缬草素的抗焦虑活性研究[J]. 中草药,2016,47(8):1361.
- [12] 赵梅,龙厚宁,贺欢,等. 蜘蛛香挥发油的气相色谱指纹图谱[J]. 医药导报,2016,35(3):291.
- [13] 郜红利,谭玉柱. 恩施州野生蜘蛛香特征指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(7):1749.
- [14] 付思红,姚成芬,张宝,等. 蜘蛛香药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2017,48(21):4537.
- [15] 李业生,梁宁,温家顺. 常用同源异功中药辨析[J]. 中国药业,2002,11(12):55.